[1] 哺乳动物细胞灌流培养工艺研究进展

苏爽[1]　金永杰[2]　黄瑞晶[2]　李 剑[2]　徐寒梅[1]

（1 中国药科大学　南京　211100　2 天士力生物医药股份有限公司　上海　201203）

摘要：当前生物制药领域，由于成本压力、市场需求急剧波动以及生物仿制药的竞争日益激烈，现有的生物制造技术受到诸多挑战，生物技术公司越来越倾向于开发灵活、高效的创新型生产制造工艺。灌流培养作为当前哺乳动物细胞培养的重要工艺之一，不仅可以通过不断移出副产物和添加营养物来提供有利于细胞的稳定环境，以解决蛋白质量不稳定或者表达量偏低等问题，还可以通过提高单位体积产率来优化产能利用率并提高生产效率。本文就灌流培养用于哺乳动物细胞培养的研究进展做了系统介绍，并为其进一步开发与应用提供参考。

关键词：灌流培养；哺乳动物细胞；培养工艺；连续性工艺

The Research Progress of Perfusion Mammalian Cell Culture

SU Shuang[1]　JIN Yong-jie[2]　HUANG Rui-jing[2]　LI Jian[2]　XU Han-mei[1]

(1 China Pharmaceutical University, Nanjing 211100, China)

(2 Tasly Biomedical Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract: In the current environment of biopharmaceuticals, cost pressures, rapidly fluctuating market demands and growing competition among biosimilars, existing bio-manufacturing technologies are challenged, and so that biotechnology companies are increasingly driven to develop innovative solutions for highly flexible and cost-effective manufacturing. As one of the important processes in mammalian cell culture, perfusion culture has two advantages. Firstly, it can provide a stable environment favorable to cells by continuously removing by-products and adding nutrients, so that it can solve the problems of unstable protein amount or low expression level. Also, it can optimize capacity utilization and increase production efficiency by increasing volumetric productivity. This paper systematically reviewed the progress of perfusion culture for mammalian cell culture，and it provides reference for further development and application.

Key words: perfusion culture; mammalian cells; culture process; continuous process

1. 背景介绍

在美国或欧洲的临床开发阶段有超过 900 种生物制药产品，其中大部分是在哺乳动物细胞培养系统中生产的，且人源化重组蛋白的加工只能通过哺乳动物细胞培养来实现，因此哺乳动物细胞培养工艺的开发对生物制药产业显得尤其重要[1][2]。

通讯作者:李 剑，电子信箱：lijian16@tasly.com; 徐寒梅，电子信箱：1037714870@qq.com

目前，生物制造行业最主要的培养模式是批次培养和补料批次培养。大多数生物药物分子是不稳定的，在批次和补料批次培养过程中，细胞产生的代谢产物、死亡细胞释放的酶、以及渗透压的增加对细胞生长都是不利的，对于蛋白质量也是不利的[3]。随着人们对生物制药工艺的深入研究，治疗性蛋白的连续一体化生产在实验室、临床领域以及商业制造领域正在逐渐取代传统的批次培养[4]。FDA等监管机构鼓励生产工艺的改进与创新，其中包括连续性制造，这种转变受到新兴技术以及仿制药模型研究者的青睐[5]。

灌流培养通过不断移出副产物，同时补充营养物质，因此可提供对细胞稳定且有利的生长环境。与批次培养和补料批次培养相比，灌流培养可以在高细胞密度环境下长时间维持稳定培养环境，同时降低产物在培养基里的停留时间，这有利于提高产品质量[6]。Ahn 等[7]研究发现，灌流培养可实现培养基组分中的动态变化对蛋白质糖基化的影响最小，这一研究结果表明灌流培养有利于提高产品质量。

对于细胞培养而言，灌流培养并不是一种新兴技术。自 20 世纪 90 年代以来，许多商品化生物药物采用灌流培养，例如阿昔单抗、β-葡糖脑苷脂酶、英夫利昔单抗、巴利昔单抗、干扰素β-1α、重组人凝血因子 VIII、戈利木单抗等[8]。

传统的灌流培养多借助微载体，微包囊法进行连续灌流[9][10][11]。国内现已有将传统灌流培养工艺成功用于生产的案例，药物普佑克（注射用重组人尿激酶原）采用无血清连续灌流培养技术实现大规模生产，用于急性 ST 段抬高心肌梗死治疗，该药物于 2011 年成功上市[12]。

当前多样化的生产环境中，生物技术公司越来越倾向于开发高度灵活和高效能的生产制造工艺[9]。灌流培养作为实现提高稳定性低的重组蛋白产量的有效手段已广泛用于生物工程产业[6]。灌流培养能够凭借小型生物反应器生产达到补料批次培养大规模生产所得的蛋白量，实现了培养规模小型化，增加了操作的灵活度[14]。

2. 灌流培养

2.1 细胞截留系统

分离装置的稳固性对于有效分离和实现高细胞密度至关重要[6][14][15]。目前，用于灌流培养的细胞截留系统主要有两种，切向流过滤（Tangential flow filtration，TFF）和交替切向流过滤（Alternative tangential filtration，ATF）。对于 TFF，细胞液通过蠕动泵作用形成一个连续的环形流动方向，进入纤维膜后，废液会通过膜排出体系之外，细胞会随着环路重新回到培养体系之内。ATF 是通过隔膜泵的往复吹吸作用，实现罐内培养基在截留设备中的往复流动，同时代谢废物会随着培养基通过膜排出而细胞截留在反应器内。使用 ATF 时，交替运动在过滤膜中产生冲刷作用，有助于防止纤维膜堵塞[15]。并且，ATF 在提高单位体积产率上也有优势，Bosco B 等[16]研究表明当使用 ATF 代替内部旋转过滤器（internal spin filter，ISF）时，单位体积产率可提高 50~70％。

ATF 是目前采用更多的一种方式，但是也有研究发现 ATF 在提高细胞密度上的优势不如 TFF，据 Clincke 等[17]报道，在密度为 $20\sim30\times10^6$ cells/ mL 情况下使用 ATF 和 TFF 均可持续培养 2 周；在高密度 $90\sim100\times10^6$ cells/ mL 下，使用 ATF 可维持 4 天，而使用 TFF 可持续培养两周。因此对于 ATF 和 TFF 的选择需要综合考虑细胞的适用程度。

目前也存在一些新型细胞截留装置用于灌流培养，Kwon 等[18]介绍了一种基于惯性分离的微流体细胞截留系统，用于悬浮哺乳动物细胞的灌流培养，但是该装置现只用于实验室规模的培养。

2.2 N 级灌流细胞培养

N 级生物反应器（生产型生物反应器）中，由于营养或设备限制，细胞量可迅速达到系统容量的上限，细胞活力迅速下降[4]。N 级生物反应器在使用灌流培养时，实现对细胞密度的有效控制可以防止上述情况，并且细胞量可稳定维持较长的生产期。通常使用半连续或连续性排细胞来控制细胞密度。Karst 等[19]人使用 TFF 和 ATF 通过连续性排细胞可将细胞密度控制在 20，40，60×10^6 cells/ mL 三个稳定阶段，每个阶段可维持一周以上的时间。

2.3 整合连续性操作

随着反应器灌流培养与下游纯化的结合，连续性操作得以深入研究，其优势也越来越明显，它有利于捕获和纯化过程。由于树脂的价格昂贵，增加捕获步骤

的树脂利用率显得越发重要。Steinebach 等[20]介绍了一种连续处理细胞培养发酵液的双柱捕获系统，与批次培养的连续捕获相比，该方法的树脂亲和捕获性能利用率提高了 2.5 倍，该系统同时具有预测产量、生产率和产能利用率等工艺性能的功能。Angelo 等[21]在最近的中试规模试验中确认了该性能的提高。Steinebach 等[23]最新研究表明，连续捕获过程的灌流培养可实现纯度更高的蛋白质稳定的生产。

2.4 灌流培养工艺的应用

2.4.1 细胞库和种子培养

减少种子培养时间是工艺优化的一个重要方面[22]。为了缩短接种 N 级生物反应器达到所需活细胞密度的时间，提高初始细胞量是一种有效方法。通常可采取两种方式：增加接种物体积或浓度。增加接种体积可使用高密度冷冻管（如 5 mL 冷冻管）或冷冻袋（如 50 或 100 mL 冷冻袋）来实现。增加接种物浓度可使用灌流培养技术，该技术已被用于制备高密度细胞库（HD Cell Bank），通过在 N-1 生物反应器阶段联合使用高密度细胞库、一次性技术和灌流培养系统，建立了新型种子细胞培养技术[6][24]。这种新技术通过减少中间放大的次数和清洁、组装、灭菌等人为操作的需求来降低种子培养过程的复杂性。

2.4.2 浓缩补料批次培养

浓缩补料批次（Concentrated fed-batch，CFB）细胞培养通过使用灌流培养技术，结合使用超滤模块截留细胞和蛋白产物。CFB 可实现灵活的生产，在有限的体积下增大细胞密度，使得小型生物反应器的产量可以与大型生物反应器相媲美。Yang 等[25]通过制定 CFB 培养并将其应用于两种细胞系，在实验室规模生物反应器上进行了相关试验。与传统的补料批次培养相比，CFB 培养将细胞系 A 产量提高了 105%，细胞系 B 产量提高了 70%，并且对产品质量没有明显影响，细胞系 B 的电荷异质性还有所改善，这表明 CFB 具有工艺和产品质量的优势。

2.4.3 混合培养工艺

Hiller 等[26]在混合培养工艺研究中，培养前 4 天使用灌流培养以快速增加细胞量，之后停止灌流并每天连续补加浓缩补料。该研究使用 5 种 CHO-k1 细胞，最高产率比传统补料批次培养增加 2.5 倍。培养过程中，细胞密度达到 60~80×

10^6 cells/ mL，灌流培养基消耗量相对较低（是最终生物反应器体积的 1~1.8 倍）。该工艺通过使用新型灌流调控系统，能够在线监控并自动控制灌流速率进而实现自动化。因此，该工艺可改善现有生产线的性能。

3. 灌流培养工艺的开发

3.1 工艺控制

稳定的工艺需要适当控制培养基的补进和流出速度，保持所需的灌流速率。通过活细胞浓度的实时监测、稳定理想的细胞特异性灌流速率（cell specific perfusion rate，CSPR）以及灌流速率等参数来调节细胞排出量，反应器内可维持恒定的工作体积和细胞密度。没有细胞密度在线控制系统的情况下，最常使用半连续排细胞方式控制细胞量。Karst 等[19]通过线上和线下控制系统完成连续排细胞以维持细胞密度稳定，但是线下控制水平对生产工艺性能和产品质量存在一定的影响，这种半连续方式在商业规模的生产中需谨慎使用。

单位体积产率和产品质量是生物制药细胞培养过程的两个关键性能指标。Yang 等[27]使用三种不同的 CHO 细胞系灌流培养，通过提高单位体积产率来优化产能利用率和生产效率，同时能保持或提高产品质量。J. Rodriguez 等[28]研究表明在 CHO 细胞生产重组人干扰素-β（β-IFN）时，低温灌流培养与批次培养相比，产率可提高 3.5 倍，单位体积产率提升 7 倍，并且可降低 39%的聚集体和提高一定的生物活性。Hiller 等[26]研究发现在生物反应器中进行短时间灌流，紧接着使用高浓缩补料进行常规补料分批培养，与传统补料分批工艺相比，整体产率增加近一倍。Warikoo 等[9]研究表明，灌流反应器和四柱式周期性逆流色谱（four-column periodic counter-current chromatography, PCC）的整合系统用于连续捕获目的蛋白，比当前灌流或补料分批培养的单位体积产率高得多。

3.2 培养基筛选

在细胞培养开发和优化过程中，培养基的开发是最重要的一个方面。一方面是因为培养基对于工艺性能而言是首要的，另一方面是出于安全考虑。第一种细胞培养基使用动物衍生制品[29]，使用相应产品的病人将暴露于许多危险因素，如病毒等。

解耦灌流培养基（即不同口流入以便能够更好地控制特定营养素和灌流速率）

的概念对于培养基开发有了新的启发。Lin 等[30]使用基于补料批次培养工艺的基础培养基和浓缩补料按一定比例混合获得一种浓缩培养基，在此基础上进而开发出一种有效的灌流培养基。在获得最佳比例并调节一些营养物质浓度和渗透压后，获得的培养基仅需要一半的灌流速度就可维持 30×10^6 cells/mL 的密度。这为灌流培养基的开发提供了参考作用。

3.3 培养规模小型化

微型生物反应器是小型培养的另一种选择，它可提供 pH 和 DO 在线监控[32]，到目前为止主要用于补料分批培养，但也进行了一些半连续培养基交换试验。Gomez 等[33]通过使用半连续摇管操作和灌流反应器研究了 13 个克隆，并以此优化了补料批次培养过程。最近，一些商业化新型反应系统具备连续的培养基交换和细胞截留能力，这些设备已证明其在补料分批中的生产效率，并且可能在灌流过程开发中发挥重要作用，但仍需要更多数据来评估其全部潜力。

3.4 关键质量属性

批量生产向连续性生产转型的驱动因素有两点，一方面是节省运营成本，更重要的是提升目的蛋白质量[4]。在非连续生产系统中，比如批次培养和补料批次培养中，累积的有毒物质和反应副产物对目的产物的质量有不利影响[3]。在灌流培养工艺中，在整个培养期间可维持稳定的培养环境，反应器中所有的动力学参数，包括与杂质或翻译后修饰有关的动力学参数，不会随时间变化，因此反应器内几乎产生相同产物，没有批次培养和补料批次培养的累积效应[4]。

Gomez 等[33]研究表明，质量属性中如半乳糖基化，非岩藻糖基化和聚体在摇管和小型生物反应器模型中是相当的，其他质量属性更多地取决于产品停留时间，例如脱酰胺，C-末端赖氨酸化和剪切等在半连续模式中被发现是不同的。因此，灌流培养可通过减少产物在培养基内的停留时间提高质量属性。

4. 展望

4.1 灌流培养工艺的优势

灌流培养通过不断移出副产物和添加营养物来提供有利于细胞的稳定环境。与批次培养和补料批次培养相比，在高密度细胞环境下，灌流培养模式可以延长

良好培养环境的时间，降低产物在反应器内的停留时间，这对于产品质量是有利的，对于性质不稳定的产品也是必要的[35]。

此外，目前生物技术公司需要快速调整生产能力以适应波动的市场需求，来自生物仿制药公司越来越激烈的竞争进一步推动降低成本[9][35]。与补料批次培养相比，灌流培养的另外一种优势是可以使用更小型的生物反应器，这意味着灌流培养可以减少清洁操作，其较小的反应体积可使用一次性生物反应器代替不锈钢反应器。灌流培养除了可以用于生产生物制品以外，还可以用于生产高密度种子库，细胞库或者是作为蛋白药物生产的研究工具。灌流培养可以以高细胞密度生产目的蛋白产物来补偿低细胞产率的不足，这将节省工艺开发的人力需求。

从法规层面来看，FDA 等对连续连生产持开放和支持的态度，他们认为连续灌流是一项能带来稳定和更高效生产的技术[5][34][35]。由于灌流培养具备多样化产品线，国内一些大型生物制药企业也开始尝试从传统的补料批次培养向灌流培养转变，以期待解决传统培养工艺存在的问题。

4.2 灌流培养工艺的不足

灌流培养也存在缺点，在技术开发及无菌工艺上存在诸多挑战，并且培养产生多个收集批次的产品汇集成许多中等体积的收集物不断累积，需要进一步处理[15]。

长期高密度细胞的灌流培养，多数细胞截留装置堵膜的风险明显提高。新型细胞截留装置的产生可以较好的解决这一问题。ATF 的交替运动在过滤膜中产生冲刷作用，有助于防止纤维膜堵塞[16]。Xu 等[31]通过添加聚醚（泊洛沙姆）来优化灌流培养基，添加低浓度聚醚有利于产物以及宿主蛋白透过细胞截留装置，同时对细胞具有保护作用，这一点有利于降低堵膜的风险。

国内外灌流培养工艺开发所用的灌流培养基多为自主开发，目前商品化的灌流培养基十分有限，这对灌流培养工艺的开发有一定的阻碍。灌流培养基的营养成分通常比普通的基础培养基营养丰富，研究显示，基础培养基与浓缩补料按一定比例混合制成的灌流培养基可以维持较高的细胞密度与活率[25]。Yang 等[27]研究表明，使用两倍浓缩的培养基用于 N-1 灌流生物反应器时，可降低灌流速率，

同时细胞生长速率可以更高。基于此研究，灌流培养基的开发有了一定的研究方向。在成本控制方面，Xu 等[31]同时研究了同一细胞在不同工艺下的产率，发现生物反应器利用率高时，灌流培养的培养基成本有望低于补料分批培养的培养基成本。

生物技术领域严格的质量要求及监管要求下，生物制药行业追求最短的开发时间和控制最少的成本，这些因素必然导致其对新技术的实施持保守态度。通常情况下，企业只会采取渐进式优化措施，而更为重要的技术革新不再那么普遍。生物技术创新变得更加以产品为中心的创新而不是以培养工艺为中心的创新。上述商业驱动仍然占据主导地位，但是现如今，生物技术公司需要灵活的适应大量和小量需求的药物（小生境或孤儿药），最好能在同一生产线内完成。未来的生物制造工厂正在从大型单一生产线向更小、更多元化、更灵活的生产线转变，灵活的生产线使公司能够适应不断变化的市场需求[25]。Yang 等[25]研究表明，灌流培养有望在产能上实现小型生产设备取代大型生产设备的目标。

5. 结语

灌流培养作为一种新型技术极大的拓展了人们对生产工艺的理解，它解决了因蛋白质量不稳定或者表达量偏低，以及补料批次培养无法保证批次稳定控制等一系列问题，而且可去除中间一些不必要的放大步骤，简化了生产工艺。但与此同时，其特定的培养模式也面临着一些挑战，比如如何在长时间的培养中防止染菌，验证从收获到纯化得到的各“亚批次”之间的一致性等，这些问题在企业临床研究申请（IND）时会显得尤为重要。

上述讨论的工艺开发关键点看似相互分离，但实则牵一发而动全身，实际过程中切不可只考虑到某一因素对结果的影响，而应采用多变量分析的方法充分考虑不同变量之间的关系，以及综合效应对产物表达和质量的影响。因此，实现高质量蛋白稳定均一表达与生产的连续灌流培养工艺还需要投入更多的时间和精力。

参考文献

[1] Gaughan C L. The present state of the art in expression, production and characterization of monoclonal antibodies.[J]. Molecular Diversity, 2016, 20(1):255-270.

[2] Sommeregger W, Mayrhofer P, Steinfellner W, et al. Proteomic differences in recombinant CHO cells producing two similar antibody fragments[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2016, 113(9):1902-1912.

[3] Karst D J, Scibona E, Serra E, et al. Modulation and modeling of monoclonal antibody N‐linked glycosylation in mammalian cell perfusion reactors[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2017, 114(9):1978-1990.

[4] Karst D J, Steinebach F, Morbidelli M. Continuous integrated manufacturing of therapeutic proteins.[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2017, 53:76–84.

[5] Kleinebudde P. 3. Regulatory and Quality Considerations for Continuous Manufacturing[M]// Continuous Manufacturing of Pharmaceuticals. John Wiley & Sons, Ltd, 2017:107-125.

[6] Tapia F, Vázquez-Ramírez D, Genzel Y, et al. Bioreactors for high cell density and continuous multi-stage cultivations: options for process intensification in cell culture-based viral vaccine production[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2016, 100(5):2121-2132.

[7] Ahn W S, Jeon J J, Jeong Y R, et al. Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells.[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2010, 101(6):1234-1244.

[8] Pollock J, Ho S V, Farid S S. Fed-batch and perfusion culture processes: economic, environmental, and operational feasibility under uncertainty.[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2013, 110(1):206-219.

[9] 肖成祖, 陈昭烈, 黄子才,等. 动物细胞微载体灌流培养技术的研究和应用[J]. 医学研究杂志, 2000(11):16-17.

[10] 米力, 李玲, 冯强,等. 连续灌流培养杂交瘤细胞生产单克隆抗体[J]. 生物工程学报, 2002, 18(3):360-364.

[11] 米力, 陈志南. 动物细胞大规模培养生产蛋白的工艺选择[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(7):1-6.

[12] 赵子淇, 褚淑贞, 吴洁. 基于DCF模型的创新药品估值研究——以普佑克为例[J]. 现代

商贸工业, 2018(13).

[13] Warikoo V, Godawat R, Brower K, et al. Integrated continuous production of recombinant therapeutic proteins.[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2012, 109(12):3018-3029.

[14] 李尤，周航，李锦才，等. 哺乳动物细胞灌流培养技术的开发与应用[J]. 中国医药生物技术，2015，V10(3)：267-270.

[15] Zhang Y, Stobbe P, Silvander C O, et al. Very high cell density perfusion of CHO cells anchored in a non-woven matrix-based bioreactor[J]. Journal of Biotechnology, 2015, 213:28-41.

[16] Bosco B, Paillet C, Amadeo I, et al. Alternating flow filtration as an alternative to internal spin filter based perfusion process: Impact on productivity and product quality[J]. Biotechnology Progress, 2017, 33.

[17] Clincke M, Mölleryd C, Zhang Y, et al. Study of a recombinant CHO cell line producing a monoclonal antibody by ATF or TFF external filter perfusion in a WAVE Bioreactor™.[J]. Bmc Proceedings, 2011, 5(S8):105-107.

[18] Kwon T, Prentice H, Oliveira J D, et al. Microfluidic Cell Retention Device for Perfusion of Mammalian Suspension Culture[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1):6703-6713.

[19] Karst D J, Serra E, Villiger T K, et al. Characterization and comparison of ATF and TFF in stirred bioreactors for continuous mammalian cell culture processes[J]. Biochemical Engineering Journal, 2016, 110:17-26.

[20] Steinebach F, Angarita M, Karst D J, et al. Model based adaptive control of a continuous capture process for monoclonal antibodies production[J]. Journal of Chromatography A, 2016, 1444:50-56.

[21] Angelo J, Pagano J, Müller-Späth T, et al. Scale-Up of Twin-Column Periodic Counter-Current Chromatography for MAb Purification[J]. Bioprocess International, 2018, 16(4).

[22] Tao Y, Shih J, Sinacore M, et al. Development and implementation of a perfusion-based high cell density cell banking process.[J]. Biotechnology Progress, 2011, 27(3):824-829.

[23] Steinebach F, Ulmer N, Wolf M, et al. Design and operation of a continuous integrated monoclonal antibody production process[J]. Biotechnology Progress, 2017, 33(5): 1303-1313.

[24] Wright B, Bruninghaus M, Vrabel M, et al. A novel seed-train process: Using high-density cell banking, a disposable bioreactor, and perfusion technologies[J]. Bioprocess International, 2015, 13.

[25] Yang W C, Minkler D F, Kshirsagar R, et al. Concentrated fed-batch cell culture increases manufacturing capacity without additional volumetric capacity[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 217:1-11.

[26] Hiller G W, Ovalle A M, Gagnon M P, et al. Cell-controlled hybrid perfusion fed-batch CHO cell process provides significant productivity improvement over conventional fed-batch cultures[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2017.

[27] Yang W C, Jiuyi L, Chris K, et al. Perfusion seed cultures improve biopharmaceutical fed-batch production capacity and product quality[J]. Biotechnology Progress, 2014, 30(3):616-625.

[28] Rodriguez J, Spearman M, Tharmalingam T, et al. High productivity of human recombinant beta-interferon from a low-temperature perfusion culture[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 150(4):509-518.

[29] Yao T, Asayama Y. Animal ‐ cell culture media: History, characteristics, and current issues[J]. Reproductive Medicine & Biology, 2017, 16(2):99-117.

[30] Lin H, Leighty R W, Godfrey S, et al. Principles and approach to developing mammalian cell culture media for high cell density perfusion process leveraging established fed-batch media.[J]. Biotechnol Prog, 2017.

[31] Xu S, Jiang R, Chen Y, et al. Impact of Pluronic® F68 on hollow fiber filter-based perfusion culture performance.[J]. Bioprocess & Biosystems Engineering, 2017, 40(9):1-10.

[32] Bareither R, Bargh N, Oakeshott R, et al. Automated disposable small scale reactor for high throughput bioprocess development: a proof of concept study[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2013, 110(12):3126-38.

[33] Gomez N, Ambhaikar M, Zhang L, et al. Analysis of Tubespins as a Suitable Scale-down Model of Bioreactors for High Cell Density CHO Cell Culture[J]. Biotechnology Progress, 2016, 33(2):490-523.

[34] Allison G, Cain Y T, Cooney C, et al. Regulatory and quality considerations for continuous manufacturing. May 20-21, 2014 Continuous Manufacturing Symposium.[J]. Journal of

Pharmaceutical Sciences, 2015, 104(3):803-812.

[35] Bielser J M, Wolf M, Souquet J, et al. Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing - A critical review.[J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(4):1328-1340.